

糖尿病白ネズミのインシュリン応答性について(第3報)

伊東ツヨ子*・片山(須川)洋子

Effect of Daily Administration of Insulin on Liver Enzyme Activities in Alloxan Diabetic Rats (part 3)

SOYOKO ITOH AND YOHKO SUGAWA-KATAYAMA

はじめに

アロキサン糖尿病白ネズミにトウモロコシ澱粉を糖質源としたときは前報¹⁾において報告したように、(1)インシュリンを投与した群の体重増加が良好であった。(2)肝臓や腎臓の臓器重量もインシュリンを投与した群の方に大きい傾向がみられた。(3)肝臓のhexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), serine dehydratase (SDH), glucose-6-phosphatase (G6Pase)のうち、インシュリン投与の影響を受けたのはG6PDHとSDHであった。

本報では糖質源をソルビトールまたは果糖に変えて飼育した場合、アロキサン糖尿病白ネズミがインシュリン投与に対してどのような応答を示すかについて観察した。

実験方法

1) 供試動物および飼料組成

Sprague-Dawley 系の雄白ネズミ (90~100 g) を固型飼料 (日本クレアKK C E-2) で予備飼育したのち表-1に示すA~Eのグループに分けた。飼料組成は表-2に示した。糖質については糖質源をトウモロコシ澱粉とした群 (A, B, E) には65.3%のトウモロコシ澱粉を、また果糖とした群 (D) には果糖を65.3%与えた。ソルビトール群 (C) には白ネズミが多量のソルビトールになじまないので3%よりはじめて3日おきに6%、9%と順次3%づつ増して20日間で20%にし残部45.3%はトウモロコシ澱粉とした。いずれのグループもこの実験食で5日間飼育したのち白ネズミを20時間の絶食状態におきアロキサン (15mg/100 g 体重) を腹腔内に注射した。その1週間後から体重100 g 当たり1国際単位 (プロタミン亜鉛イスリジン[®]シミツ[®]清水製薬製) を3週間毎日腹腔内に注射した。インシュリンを注射しない対照群にはインシュリンと等容量の生

* 大阪女子短期大学

理的食塩水を注射した。実験期間中は食餌と水を自由に摂取させ、毎日ほぼ一定時間 (午前10時前後) に体重および飼料の摂取量を測定した。飼育室内の温度を23℃ ± 1に、また湿度を60%とし、照明は午前8時から午後8時までとした。

表-1 Experimental design

Rats	Group	Carbohydrate	Insulin-administration	Determines
Alloxan Diabetes	A*	Cornstarch	Week 0 —	7
	B	Cornstarch	3 + —	7 7
	C	Sorbitol	3 + —	5 5
	D	Fructose	3 + —	6 6
Normal	E	Cornstarch	3 —	7

* alloxan投与後1週間飼育し実験に供した

+ with insulin
— without insulin

表-2 Composition of diet (%)

Carbohydrate (cornstarch or sorbitol or fructose)	65.3
Cellulose	4.0
Casein	20.0
Corn oil	5.0
Salt mixture	5.0
Choline-Cl	0.2
Vitamin-mixture	0.5
Vitamin A and D	15 drops/1000 g in diet

2) 採血および酵素液の分離

インシュリン投与最終日の翌日、午後2時に飼料をとりのぞいて白ネズミを20時間の絶食状態においたのちペントバルビタールで麻酔して開腹した。腹部大動脈より採血した血液について血糖値およびインシュリン濃度を測定した。血糖値はグルコースオキシダーゼ法²⁾により、血中インシュリンはイヌセイ¹²⁵Iを用いての二抗体法³⁾によって定量した。採血後ただちに肝臓をとり出して精秤し、0.1Mトリス緩衝液 (pH8.0) を用いて20%ホモジェネートを作製した。このホモジェネート液を3,000

r.p.m で5分間遠心分離し、さらにその上清を105,000×gで60分間遠心分離した。こうして得られた上清をSephadex G-25のカラム(1.5×10cm)を通し酵素源とし、hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), serine dehydratase (SDH) 活性を測定した。一方105,000×gで沈殿した画分(いわゆるミクロソーム)を0.1Mトリス緩衝液で2回洗浄のち、glucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性測定のための酵素源とした。これら諸酵素活性を前報¹⁾と同様の方法で測定した。

実験結果および考察

1) 体重の増加および飼料の摂取量

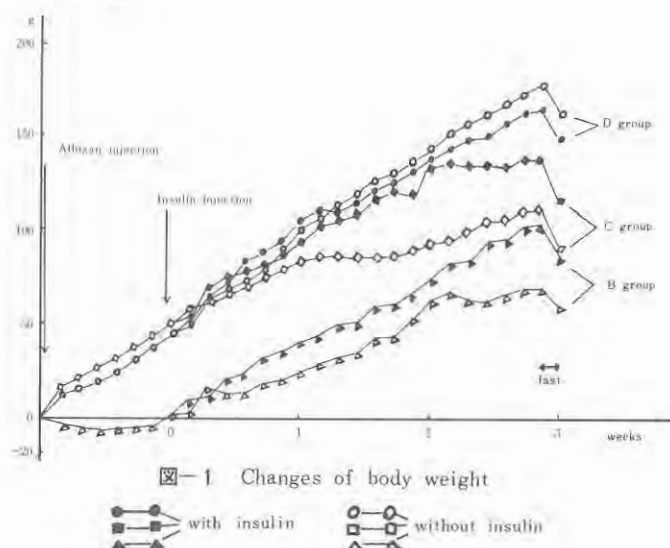


図-1 Changes of body weight

図-1に各群のアロキサン投与後の体重変動を示した。糖質源としてトウモロコシ澱粉(B)を用いた場合、アロキサン投与前の体重増加量は6.6 g/day、その1週間後は全く体重の増加がみられなかった。インシュリンを3週間連続投与した場合白ネズミの体重増加はインシュリン投与群5.2 g/day(対照群3.3 g/day)であった。ソルビトールを糖質源としたとき(C)白ネズミの体重増加はアロキサンの投与前7.7 g/day、アロキサン投与1週間後7.0 g/day、インシュリン連続投与3週間後ではインシュリン群4.5 g/day(対照群3.3 g/day)であった。果糖を糖質源とした場合(D)にはアロキサン投与前7.1 g/day、アロキサン投与1週間後6.5 g/day、インシュリンの連続投与3週間後ではインシュリン群6.1 g/day(対照群6.8 g/day)であった。ここでインシュリンの連続投与3週間後の体重増加を糖質源の違いにより比較すると、糖質源を果糖としたときがインシュリン投与

群、対照群いずれにおいても一番良好であった。インシュリン投与による影響はトウモロコシ澱粉、ソルビトールを糖質源としたときに観察された。すなわち、インシュリン投与群が対照群に比較して体重増加が大きかった。飼料の摂取量については次のような結果を得た。糖質源がトウモロコシ澱粉の場合(B)アロキサン投与前21.6 g/day、アロキサン投与1週間後17.6 g/day、インシュリンの連続投与3週間ではインシュリン群21.2 g/day、(対照群23.1 g/day)であった。糖質源がソルビトールの場合(C)アロキサン投与前19.5 g/day、アロキサン投与1週間後17.7 g/day、インシュリンの連続投与3週間後ではインシュリン群18.1 g/day(対照群19.6 g/day)であった。また糖質源が果糖の場合(D)にはアロキサン投与前16.5 g/day、アロキサン投与1週間後17.5 g/day、インシュリンの連続投与3週間後ではインシュリン群20.7 g/day、(対照群22.1 g/day)であった。この

ように飼料の摂取量では糖質源を変えた3群の間に大きな差がみられなかったにもかかわらず、果糖で正常白ネズミの場合と同様⁴⁾体重増加の大きかったことは、トウモロコシ澱粉やソルビトールに比較して果糖の利用効率が高かったためによるのであろう。しかしアロキサン投与後1週間の体重変動をみると糖質源がソルビトール、果糖では投与前と変わらない体重増加を示しているのに対して、トウモロコシ澱粉では減少した。アロキサン作用の一律性についても一考を要する。

2) 血糖値

血糖値は図-2(a)に示した。いずれのグループにおいても正常白ネズミ(118mg/ml)にくらべてアロキサン糖尿病白ネズミでは高い値を示した。各群ともインシュリンを投与したものと投与しないものとの間に差は認められなかった。しかしトウモロコシ澱粉(B)の場合にはインシュリン投与群の血糖値(238±27mg/100ml)が対照群のそれ(190±24mg/100ml)より高かった。ソルビトール(C)ではインシュリン投与群、対照群ともに他の糖質源(B, D)に比較して低い傾向が認められた。

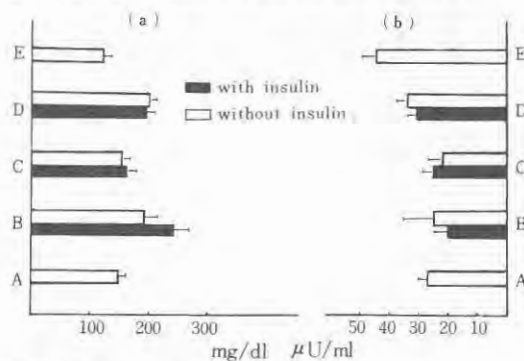


図-2 Blood sugar (a) and serum insulin (b)

3) 血中インシュリン濃度

各グループの血中インシュリン濃度を図-2(b)に示した。正常白ネズミの血中インシュリン濃度(44.9 μ U/ml)にくらべていずれのグループも低い値で、インシュリン投与による影響はほとんどみられなかった。果糖(D)の場合、他のトウモロコシ澱粉(B)やソルビトール(C)の場合に比し血中インシュリン濃度が高い傾向を示した。

血糖値と血中インシュリン濃度を対応させてみると、B, C, Dグループの中でBグループは血糖値は高く、血中インシュリン濃度は低くに対応していた。それに対してCグループは血中インシュリン濃度が低いにもかかわらず血糖値も低いという特異な結果であった。このことは須川の報告⁵⁾⁶⁾にみられるようにソルビトールがト

ウモロコシ澱粉や果糖と代謝経路を異にし、インシュリン依存性が少ないことによるのではなからうか。

測定した血中インシュリン濃度はインシュリン投与後48時間経た時点での値であるから内因性のインシュリン分泌によるものと考えられる。インシュリン投与群と対照群との間にほとんど差がなく、むしろ低くなる傾向さえ示しているのは、インシュリンの連続3週間にわたる投与によって内因性のインシュリン分泌が低下しているためではなからうか。

4) 肝酵素活性

各グループの肝酵素活性を図-3, 図-4に示した。

HK: 糖尿病白ネズミ(A, B, C, D)の本酵素活性は正常白ネズミのそれより低い傾向を示した。トウモロコシ澱粉、果糖を糖質源としたB, Dグループではインシュリン投与群の活性が対照のそれより低い値であった。

G6PDH: 糖尿病白ネズミと正常白ネズミの活性を比較すると、糖質源によってさまざまであった。トウモロコシ澱粉(B)では糖尿病白ネズミの活性は正常白ネズミより低く、インシュリン連続投与の影響はみられなかった。ソルビトール(C)、果糖(D)ではインシュリン投与群の活性が対照のそれより低値で特にDにおいて顕著であった。

HK, G6PDHは糖尿病時には活性が低下し、インシュリン投与により増大するといわれこのことはSoling,⁷⁾ Rudack,⁸⁾ Freedland⁹⁾らによっても報告されている。しかしこれは短期間のインシュリン投与の場合である。本実験のように3週間にわたってインシュリンを投与し続け、その上投与後48時間経過し、20時間の絶食状態において条件下では、従来の報告とは異なる結果であった。

SDH: 糖尿病時には活性が高く、インシュリン投与により低下するといわれているが、今回の実験では糖質源により異なっていた。トウモロコシ澱粉(B)、ソルビトール(C)では正常白ネズミより高く、インシュリン投与により低下の傾向を示した。果糖(D)の場合は特異で正常白ネズミの活性のほぼ1/2で、インシュリン投与の影響は全く観察されなかった。果糖を糖質源とした糖尿病白ネズミでは糖新生の要求は弱く、糖新生の入口に関与する本酵素の活性は低下しているのではなからうか。

G6Pase: アロキサン投与1週間(A)では正常白ネズミに比べて有意に活性が上昇したが、その後3週間飼育したB, C, Dでは正常白ネズミとほぼ同レベルまで下がった。またインシュリン投与の影響はいずれかのグループにおいても観察されなかった。

以上のように肝酵素活性についてみると、糖質源をか

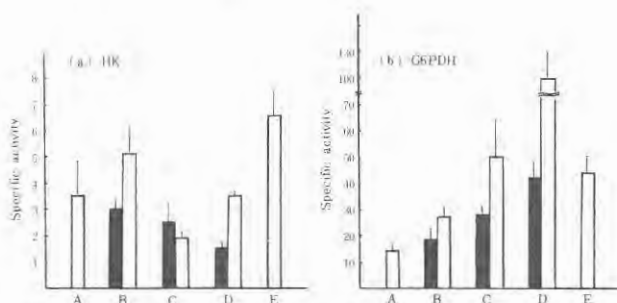


図-3 Activities of hepatic hexokinase (a) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (b) Each enzyme is expressed in specific activity (units/min/mg protein)

■ with insulin

□ without insulin

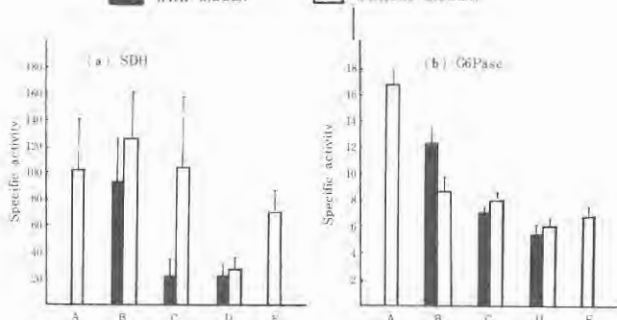


図-4 Activities of hepatic serine dehydratase (a) and glucose-6-phosphatase (b) Each enzyme is expressed in specific activity (units/min/mg protein)

■ with insulin

□ without insulin

えた3群でそれぞれ異なる活性変動を示した。なかでも本実験の条件下で果糖を糖質源としたとき、肝酵素活性の特異な応答がみられたことは注目に値し、今後、果糖の消化、吸収の面からも検討していく必要がある。

要 約

アロキサン糖尿病白ネズミを糖質源(トウモロコシ澱粉、ソルビトール、果糖)を変えて3週間飼育し、インシュリン連続投与の影響を体重増加、摂食量、血糖値、血中インシュリン濃度および肝酵素の活性について観察した。

- 1) 糖尿病白ネズミの体重増加は果糖を糖質源としたときに最も大きかったが、インシュリン投与による差はみられなかった。一方、糖質源がソルビトール、または、トウモロコシ澱粉の場合には、インシュリン投与群の体重増加が良好であった。
- 2) 糖質源のちがいによって糖尿病白ネズミの摂食量には差が認められなかった。
- 3) 糖尿病白ネズミの血糖値は正常白ネズミに比べて

て高い傾向を示したが、インシュリンの連続投与による低下はとくにみられなかった。ソルビトールを糖質源としたときに最も低い血糖値を示した。

- 4) 糖尿病白ネズミの血中インシュリン濃度は正常白ネズミよりも明らかに低い値を示した。しかしインシュリンの連続投与によって上昇する傾向はみられなかった。
- 5) 肝臓の諸酵素は糖質源のちがいによってさまざまな活性変動を示した。
 - i) 糖尿病白ネズミのHK活性は正常白ネズミにくらべて活性が低下した。インシュリンの連続投与によって活性が上昇する傾向を示したのは糖質源がソルビトールのときのみであった。
 - ii) G6PDH活性は糖質源が果糖のときに上昇し、インシュリンの連続投与によって正常値と同レベルにまで低下した。
 - iii) 糖尿病白ネズミのSDH活性は、トウモロコシ澱粉、ソルビトールを糖質源とした時高い活性を

示し、インシュリンの連続投与により活性の低下が観察された。この傾向はソルビトールにおいて顕著であった。

- iv) 糖尿病白ネズミの G6Pase 活性はアロキサンの注射 1 週間後に高い活性を示したが、3 週間後には正常値と同じレベルになった。インシュリンの連続投与による影響はいずれのグループでも認められなかった。

謝 辞

著者の一人、伊東ソヨ子は本学で研究を行うにあたりいろいろ御高配を賜りました小石教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 片山(須川)洋子, 伊東ソヨ子, 中村愛子: 阪市大

生活科学部紀要 **26**, 7 (1978)

- 2) Papadopoulos, N. H. and Hese, W. C.: Arch. Biochem. Biophys., **88**, 167 (1960)
 3) Hales, C. N. and Randle, P. J.: Biochem. J., **88**, 137 (1963)
 4) 片山(須川)洋子, 前川ソヨ子, 小石秀夫: 栄養と食糧, **24**, 423 (1971)
 5) 須川洋子: 生化学, **36**, 15 (1964)
 6) 須川洋子: 生化学, **37**, 337 (1965)
 7) Soling, H. D., Kaplan, J., Erbstoerzer, M. and Pitot, H. C.: Adv. Enz. Regulation **7**, 171 (1969)
 8) Rudack, D., Chisholm, E. M. and Holten, D.: J. Biol. Chem., **246**, 1249 (1971)
 9) Freedland, R. A., Conliffe, T. L. and Zinkl, J. G.: J. Biol. Chem., **241**, 5448 (1966)

Summary

The effect of daily insulin administration on the growth rate, serum insulin level and liver enzyme (hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, serine dehydratase and glucose-6-phosphatase) activities were studied in alloxan diabetic rats fed sorbitol, fructose or cornstarch diet.

The body weight gain was greatest in rats fed the fructose diet. There was no significant difference in the level of serum insulin between the rats given and not given insulin in all three groups.

The characteristic changes were noticed in hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and serine dehydratase activities of the fructose-fed rats.